

## タンパク質バイオジェネシス研究室 Laboratory of Protein Biogenesis

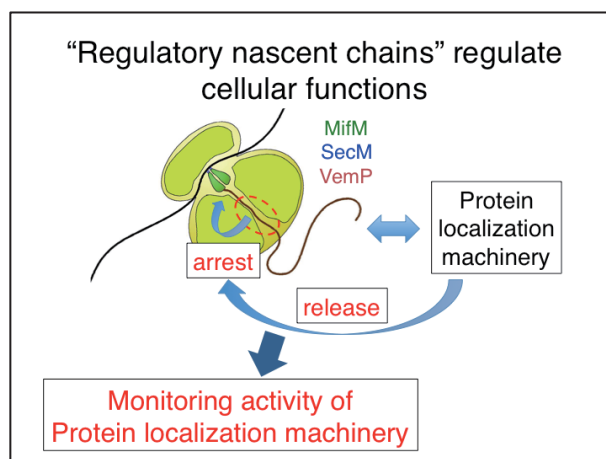
准教授 千葉 志信 Associate Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.

助教 藤原 圭吾 Assist. Prof. Keigo Fujiwara, Ph.D.

### 1. 研究概要

「4文字の羅列からなる遺伝情報がいかにして生命を生みだすのか」という問題は、生物学の中心的な問いであり続けている。単純に述べるならば、生命活動は主にタンパク質が駆動する生化学的反応の集合体と見なすことができ、DNA はタンパク質の設計図であるのだから、その設計図に基づいてタンパク質が合成されれば自ずと生命は誕生するということになる。ところが、実際には、タンパク質やその他必要な生体分子やエネルギー源を人為的に混ぜただけでは生命は誕生しない。他にも様々な要素が必要であり、例えば、生命現象の場である細胞や身体という構造体の構築のための生体分子の合成と配置の時空間制御も必要である。

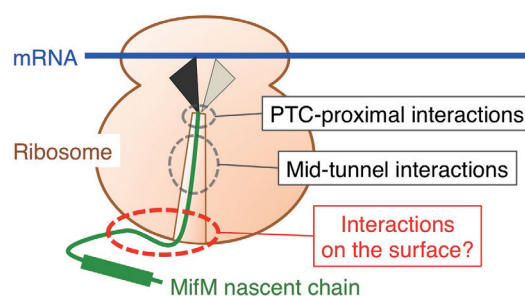
当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置（局在化）の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスと見なすことができ、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がるものと思われる。また、我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止（アレスト）する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である YidC の活性をモニターし、その機能を維持する役割を担っていることが明らかとなった。MifM の発見に先駆け本学シニアリサーチフェローであり共同研究者でもある伊藤維昭氏らが見出した大腸菌 SecM も、翻訳の途上で機能を発揮する因子のひとつである。それらの「働く翻訳途上鎖」の発見は、遺伝子の機能発現についての我々の理解を拡張するものであり、我々は、「翻訳途上鎖が主役を演じる生命現象」にも着目している。その研究を通じて、「翻訳途上鎖の分子生物学」という新たな学術分野の創成と発展に貢献したいと考えている。なお、千葉研究室は 2014 年 4 月に発足以来、シニアリサーチフェローである伊藤維昭氏との協力関係の下、研究を遂行している。本年報では、伊藤維昭シニアリサーチフェローの活動のうち、当研究室の活動に関連するものも併せて報告する。



### 2. 本年度の研究成果

#### (1) 枯草菌 MifM-リボソーム間相互作用の全容解明に向けて

枯草菌 MifM は、翻訳の途上で、自身の翻訳伸長をアレストするユニークな性質を持つ。この翻訳アレストは、MifM によるタンパク質膜挿入装置 YidC の活性のモニタリングと、それを介した YidC 経路の恒常性維持に必要である。この翻訳アレストは、MifM の C 末端付近に存在する特定のアミノ酸配列（アレストモチーフ）がリボソームの大サブユニットにあるペプチド鎖排出トンネルの内壁やリボソーム活性中心付近の成分と相互作用することで引き起こされることが示されていたが、最近になって、さらに N 末端側に位置す



る領域への変異導入によっても MifM の翻訳アレストが不安定化されることが見出された。昨年に引き続き、この N 末端領域の網羅的な変異解析を行った結果、この領域の欠失が MifM の翻訳アレストを不安定化させることが示された。また、リボソームの表面に存在するリボソームタンパク質の変異も翻訳アレストを不安定化させることが示され、これらの結果から、MifM とリボソームとの相互作用は、トンネルの内部にとどまらず、リボソームの表面を含めた非常に広範囲にわたる領域で起こるものであることが示唆された（論文投稿中）。

## （２）翻訳途上鎖によるリボソームサブユニット構造の不安定化

翻訳途上鎖が自身を翻訳するリボソームに働きかけてその活性を制御する例がいくつも見出されてきたが、今回、東京工業大学・田口英樹教授らとの共同研究で、新生鎖が自身を翻訳するリボソームの大小サブユニット間相互作用を不安定化し、終止コドンに依存せずに翻訳伸長を強制終了する現象（Intrinsic ribosome destabilization; IRD）を大腸菌において見出した。IRD は、新生鎖の特定の配列に依存し、例えば、塩基性アミノ酸残基に富んだ領域の後に酸性残基が連続したような配列や、酸性残基とプロリン残基が交互に現れるような配列などをリボソームが合成した時に起こる。たった一本のポリペプチド鎖を合成するために、リボソームの二つのサブユニットは、翻訳伸長の間、歯車のような回転運動を数百回、数千回と繰り返す。今回見出された IRD は、そのような動的な過程が潜在的に翻訳装置そのものを不安定化のリスクを内包していることを実証するものであるが、一方で我々は、大腸菌がこの現象を利用し、細胞内  $Mg^{2+}$  イオン濃度の低下時に IRD を起こすことでマグネシウムトランスポーターの発現を亢進する仕組みを持つことも見出した。

## （３）大腸菌 SecM における翻訳アレストの制御機構

我々は、枯草菌 MifM や大腸菌 SecM を「モニター基質」と呼んでいる。基質自身が発現制御因子でもあると言うユニークな仕組みによって、装置の活性変動を直接監視してタンパク質局在化因子の発現をリアルタイムに制御する。モニター基質の翻訳途上鎖が局在化装置の働きを受けると、その翻訳アレストが解除されることがこの制御の基盤になっている。最近の研究から、翻訳途上鎖に対する「引っ張り力」がアレスト解除のきっかけになることが考えられるが、細胞内での実際の機構は不明である。我々は、リボソームトンネル出口のさらに外側に近接した“Arrest Release Mediator”と名付けた SecM 内の領域が Sec 反応に呼応したアレスト解除に必要とされることを見出した。部位特異的クロスリンク実験により、この領域が特定のリボソームタンパク質に近接していることが明らかになりつつある。

## **3. Research projects and annual reports**

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM as a regulatory nascent chain that monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying a class of proteins called ‘regulatory nascent chains’, which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis. A remarkable property of this class of nascent chains is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those of the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the cellular physiology that is executed by the target gene function, allowing each nascent chain to serve as a unique biological sensor to feedback-regulate the target gene expression. In the MifM regulatory system, its translation arrest is released when the nascent MifM chain, as a monitoring substrate of YidC (the regulatory target), engages in the YidC-mediated insertion into the membrane. The regulated elongation arrest of MifM enables cells to maintain the capacity of membrane protein biogenesis. Our interests are also focused more generally on the mechanisms of protein localization and biogenesis, the biological processes where nascent substrates undergo dynamic interactions with the machineries of translation, targeting and translocation. We envision that our research activities outlined above may ultimately lead to the development of a new research area that might be called “nascent chain biology”, which

aims at understanding the still hidden principle of the central dogma of gene expression, where nascent chains are likely to play key roles.

### **This year's accomplishments**

#### 1) Extensive interactions between MifM and the ribosome are involved in elongation arrest

MifM is a regulatory nascent chain that monitors cellular activity of membrane protein insertase, YidC, by a mechanism involving regulated translation elongation arrest. The elongation arrest requires cotranslational interactions between a specific amino acid motif (arrest motif) near the C-terminus of the MifM nascent polypeptide and the ribosomal components in the region from the peptidyl transferase center through the polypeptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. Our current analysis revealed that amino acid substitution or deletion of the region N-terminal to the previously determined arrest motif of MifM caused destabilization of the elongation arrest in vivo as well as in vitro translation reactions reconstituted from purified translation components. These results suggest that the region N-terminal to the "arrest motif" also contributes to the stable elongation arrest most likely by directly interacting with the ribosome components. Such an interaction seems to involve ribosomal surface components as mutations of them also compromised elongation arrest. Our analyses reveal that the elongation arrest of MifM involves extensive interactions between the nascent chain and the ribosome (Manuscript submitted).

#### 2) Intrinsic ribosome destabilization (IRD) by nascent polypeptide

Nascent polypeptide chain can participate in the regulation of the rate of translational elongation by cotranslationally interacting with the ribosomal components. Our current collaboration with Prof. Hideki Taguchi's group (Tokyo Inst. of Tech.) now led to a discovery of a specific amino acid sequence of nascent polypeptides that could cotranslationally destabilize intersubunit interaction between the large and small subunits of the ribosome, thereby leading to a premature termination of translation elongation even before the ribosome reaches the stop codon. This phenomenon, which is termed intrinsic ribosome destabilization (IRD), typically occurs when the ribosome is synthesizing a consecutive array of acidic residues and those intermitted by alternating prolines. The IRD may represent an intrinsic risk underlying a dynamic biological process such as translation elongation, during which two ribosomal subunits have to repeat ratchet-like dynamic movement hundreds of thousands of times to synthesize just a single polypeptide chain. However, we also found that *E. coli* takes advantage of IRD to upregulate expression of a  $Mg^{2+}$  transporter in response to decreased intracellular  $Mg^{2+}$  concentration, thereby maintaining  $Mg^{2+}$  homeostasis.

#### 3) Mechanisms of arrest regulation in SecM

We call a class of regulatory nascent polypeptides, such as MifM and SecM, "monitoring substrates" as they sense the activity of protein localization machinery directly and thereby enable real-time feedback regulation. Elongation arrest in SecM is subject to cancellation ("arrest-release") when its nascent chain, having an export signal sequence, engages in the Sec-mediated translocation across the membrane. Recent studies have shown that the Sec machinery's attempt to export the nascent SecM polypeptide generates a pulling-force that triggers arrest-release, presumably by disrupting the interactions between the amino acid residues of the arrest sequence and the ribosome, thus abolishing the prerequisite for the ribosomal dysfunction. Although this scheme of export-coupled arrest release is likely to underlie the regulated translation arrest of SecM, molecular mechanisms of physiological arrest release are still left for further studies. We identified a SecM segment, termed "arrest-release mediator," that is required for the export-coupled arrest release. This

segment is located outside of the ribosome but close to the tunnel exit of the ribosome. Crosslinking experiments suggest that this region interacts with some ribosomal protein components.

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

- K. Fujiwara, K. Ito, S. Chiba: MifM-instructed translation arrest involves nascent chain interactions with the exterior as well as the interior of the ribosome. *Sci. Rep.* (2018) in press
- Y. Chadani, T. Niwa, T. Izumi, N. Sugata, A. Nagao, T. Suzuki, S. Chiba, K. Ito, H. Taguchi: Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. *Mol. Cell.* (2017) **68**, 528-539.e5.

##### 英文総説

- K. Ito, H. Mori, S. Chiba: Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. *FEMS Microbiol Lett.* (2018) 365. 11

##### 日本語解説記事

- 茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭、田口英樹：翻訳の途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化および環境のセンサーとしての利用 ライフサイエンス新着レビュー 2017年11月20日 DOI: 10.7875/first.author.2017.130
- 千葉志信 (2018) 調節性翻訳アレストペプチドによる細胞機能の制御. 生化学 第90巻第2号, 147-157.
- 茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭、田口英樹 (2018) 翻訳途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化とその生理的意義. 実験医学 Vol. 36, No. 8 (5月号) 1364-1367.

#### 5. 学会発表など

- 伊藤維昭: Nascent polypeptide handling of the translating ribosome Microbial Genetics and Genomics VII. 2017年5月4-7日 Asilomar, California (招待講演)
- 藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: Screening of translation arrest-releasable elements 新学術領域「新生鎖の生物学」主催・国際シンポジウム「Protein Quality Control」2017年6月4日 奈良・東大寺総合文化センター
- 由良隆、宮崎亮次、藤原圭吾、千葉志信、森博幸、秋山芳展: 大腸菌の熱ショック応答：研究の経過と現状 第14回21世紀大腸菌研究会 2017年6月8-9日 熱海 (招待講演)
- 伊藤維昭: トランスロコンから翻訳に立ち返って (Revisiting translation after the translocon) 第17回日本蛋白質科学会年会 2017年6月20-22日 仙台国際センター (招待講演)
- 伊藤維昭: 細胞機能を支える動的翻訳 多元物質科学研究所セミナー 2017年6月23日 東北大学 (招待講演)
- 藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: MifM の翻訳アレストを解除できる因子のスクリーニング 2017年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2017年8月25-26日 熱海
- 伊藤維昭: 生命を支える動的翻訳とタンパク質の一生 アイエム翻訳サービス株式会社主催 第3回医薬翻訳セミナー 2017年8月26日 大阪市 (招待講演)
- 藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: Screening of Translation Arrest-Releasable Elements 新学術領域「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ 2017年8月29-31日 京都・関西セミナーハウス
- 伊藤維昭: Nascent polypeptide handling of the translating ribosome THE INs-and-OUTs OF MEMBRANE BIOLOGY 2017年9月1-3日 Hemavan, Sweden (招待講演)
- 伊藤維昭: タンパク質誕生の秘密 大隅良典氏ノーベル賞受賞記念「七人の侍」講演会 2017年9月14日 福岡 (招待講演)
- 千葉志信: 働く新生鎖の生理機能と分子機構 新学術領域「新生鎖の生物学」班会議 2017年11月8-10日 別府



藤原圭吾、慲祐太郎、伊藤維昭、千葉志信：アレスト配列にシスに付加したときに翻訳アレストを解除できるタンパク質エレメントの探索 新学術領域「新生鎖の生物学」班会議 2017年11月8-10日 別府

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

科研費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」計画研究

課題名：働く新生鎖の生理機能と分子機構

研究代表者：千葉志信、研究分担者：伊藤維昭、取得年度：H26-30年（5年）

科研費補助金・基盤研究（B）

課題名：非チャンネル型タンパク質膜挿入マシーナリーの分子機構の解明

研究代表者：千葉志信、取得年度：H28-31年（4年）

### 2) 学外活動

千葉志信、藤原圭吾：新学術領域「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ主催 2017年8月29-31日、京都

伊藤維昭：Member, Faculty of 1000（論文評価システム）

伊藤維昭：生物遺伝資源に関する大腸菌小委員会及び NBRP 原核生物運営委員会委員

### 3) アウトリーチ活動

千葉志信：「ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～」“生命活動の担い手「タンパク質」の世界”主催 2017年8月19日、京都産業大学

千葉志信、藤原圭吾：日本・アジア青少年サイエンス交流事業「さくらサイエンスプラン」（代表者：加藤啓子・京産大総合生命科学部教授）に協力 2017年7月25日-8月2日

千葉志信：高大接続授業（洛西高校） 2017年7月27日

